



## (12) BREVET D'INVENTION

- (11) N° de publication : **MA 40113 A1** (51) Cl. internationale : **A01N 63/02; C12N 1/20; C05F 11/08**
- (43) Date de publication : **28.09.2018**

- 
- (21) N° Dépôt : **40113**
- (22) Date de Dépôt : **28.03.2017**
- (71) Demandeur(s) : **UNIVERSITÉ CADI AYYAD , (MA)**
- (72) Inventeur(s) : **HAFIDI MOHAMED ; BOUKESKASSE AMAL ; OUHDOUCH YEDIR**
- (74) Mandataire : **BLAÏD BOUGADIR**

---

(54) Titre : **NOUVELLES SOUCHES D'ACTINOBACTÉRIES SOLUBILISATRICES DES FORMES MINÉRALES DU POTASSIUM ET DU PHOSPHATE CAPABLES DE FIXER L'AZOTE N<sub>2</sub> EN ASSOCIATION AVEC OCHROBACTRUM SP. , FORMULATIONS D'INOCULA DE CES BACTÉRIES COMME BIO FERTILISANTS ET LEUR UTILISATION POUR LA NUTRITION ET LA SANTÉ DES PLANTES**

(57) Abrégé : Cette invention décrit l'obtention de souches d'actinobactéries comme engrais biologique complet (NPK). Ces actinobactéries sont solubilisatrices des roches potassiques (ASRK) et la roche phosphatée (ASRP) en conditions difficiles à savoir (sols calcaires et pH alcalin). En plus, leur association symbiotique avec la bactérie fixatrice d'azote atmosphérique (N<sub>2</sub>) Ochrobactrium anthropi (Ochro) les rend capables d'assurer la nutrition totale des plantes (Besoins en azote, phosphore et potassium). Elle décrit également une nouvelle formulation d'inoculum bactérien basée sur l'optimisation de certaines propriétés biologiques chez ces actinobactéries (ASRK & ASRN et Ochrobactrium) à savoir leur capacité à solubiliser et à mobiliser les formes du potassium, du phosphore et l'azote biodisponibles pour la plante à partir de formes inorganiques et organiques complexes qui ne sont pas accessibles à la plante sans son partenaire microbien (ASKP+Ochro). En incluant ensemble des spores d'actinobactéries et une source de phosphate minérale ou/et du potassium sous forme d'orthoclase en présence d'azote N<sub>2</sub> dans une matrice, la capacité des (ASRP et ASRP) à solubiliser du phosphore et du potassium et à fixer N<sub>2</sub> les rend accessibles à la plante sera accrue. De ce fait, le rôle du partenariat (ASRK+ Ochro- Plante) sur le développement de la plante hôte sera optimisé en combinant intimement l'impact de ces actinobactéries (ASKP) sur la plante

directement (effet hormonal, minéral etetc.) et indirectement (altération du potassium, du phosphate inorganique, fixation d'azote non combiné N<sub>2</sub> et protection).

**ABREGE**

Cette invention décrit l'obtention de souches d'actinobactéries comme engrais biologique complet(NPK). Ces actinobactéries sont solubilisatrices des roches potassiques (ASRK) et la roche phosphatée (ASRP) en conditions difficiles à savoir (sols calcaires et pH alcalin ). En plus, leur association symbiotique avec la bactérie fixatrice d'azote atmosphérique(N<sub>2</sub>) *Ochrobactérium anthropi* (Ochro) les rend capables d'assurer la nutrition totale des plantes (Besoins en azote, phosphore et potassium). Elle décrit également une nouvelle formulation d'inoculum bactérien basée sur l'optimisation de certaines propriétés biologiques chez ces actinobactéries (ASRK & ASRN et *Ochrobactrium* ) à savoir leur capacité à solubiliser et à mobiliser les formes du potassium, du phosphore et l'azote biodisponibles pour la plante à partir de formes inorganiques et organiques complexes qui ne sont pas accessibles à la plante sans son partenaire microbien(ASKP+Ochro). En incluant ensemble des spores d'actinobactéries et une source de phosphate minérale ou/et du potassium sous forme d'orthoclase en présence d'azote N<sub>2</sub> dans une matrice, la capacité des (ASRP et ASRK) à solubiliser du phosphore et du potassium et à fixer N<sub>2</sub> les rendre accessibles à la plante sera accrue. De ce fait, le rôle du partenariat (ASRK+ Ochro- Plante) sur le développement de la plante hôte sera optimisé en combinant intimement l'impact de ces actinobactéries (ASKP) sur la plante directement (effet hormonal, minéral et etc.) et indirectement (altération du potassium, du phosphate inorganique, fixation d'azote non combiné N<sub>2</sub> et protection).

## DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION

**Nouvelles Souches d'actinobactéries solubilisatrices des formes minérales du potassium et du phosphate capables de fixer l'azote N<sub>2</sub> en association avec *Ochrobacterium* sp. , formulations d'inocula de ces bactéries comme bio fertilisants et leur utilisation pour la nutrition et la santé des plantes**

L'azote, le phosphore et le potassium (NPK) sont une nécessité incontournable pour la croissance et le développement des plantes et par conséquent, des rendements agricoles. La plupart des sols cultivables contient du phosphore et potassium sous formes complexes insolubles. Afin de surmonter ce problème, la fertilisation phosphatée et potassique est devenue une obligation. Cependant, alors que seulement 0.1% de la fertilisation est utilisable par les plantes le reste se converti rapidement en forme insoluble ou ultérieurement lessivé dans la nappe phréatique. De plus, ce type de fertilisation chimique est une voie coûteuse et n'est pas utilisée en cultures biologiques Annuellement, plus de 161 millions de tonnes des phosphates sont extraites des mines du monde. La consommation de cet élément fertilisant est en croissance annuelle de 2.5 à 3%. Cette utilisation accrue est justifiée par la croissance de la population mondiale qui nécessitera la production alimentaire d'au moins le double d'ici 2050. Si cette demande intensive se maintient, elle aboutira inévitablement à l'épuisement des réserves totales de ce minéral. **La recherche d'autres voies supplémentaires moins chères, écologique et efficace est devenue une exigence. La mise au point d'un nouveau produit fertilisant à base de microorganismes capables de mobiliser les roches potassiques (Mica et orthoclase), les roches phosphatées et fixateurs d'azote atmosphérique N<sub>2</sub> devient donc une nécessité.**

Cette invention décrit l'obtention de **trois** Actinobactéries Solubilisatrices de la roche potassique (RK) et la roche phosphatière (RP) (ASRKP) en conditions difficiles (sols calcaires et pH basique). Ces trois souches d'actinobactéries codées (BC3, BC10 et BC11) en association symbiotique avec le genre *Ochrobacterium* (Ochra) désigné par (ASRKP + Ochra) sont capables de fixer l'azote N<sub>2</sub>. Elle décrit également une nouvelle formulation d'inoculum bactérien basée sur l'optimisation de certaines propriétés biologiques chez les ces 3 actinobactéries (ASRKP + Ochra) à savoir leur capacité fixer l'azote N<sub>2</sub>, à solubiliser et à mobiliser du phosphore et du potassium sous formes biodisponibles pour la plante à partir de formes phosphatées et potassiques inorganiques et organiques complexes qui ne sont pas accessibles à la plante sans son partenaire microbien (ASRKP+ Ochra). En incluant ensemble des spores d'actinobactéries et une source de potassium minérale ou de

phosphate minérale imbibées dans un jus de mélasse, la capacité des (ASRKP+ Ochra) à solubiliser du potassium, du phosphore à fixer N<sub>2</sub> et les rendre accessibles aux plantes. De ce fait, le rôle du partenariat (ASRKP + Ochra)- Plante) sur le développement de la plante hôte sera optimisé et total en combinant intimement l'impact de ces actinobactéries sur la plante directement (effet hormonal, minéral, etc..) et indirectement (altération du potassium et du phosphate inorganique la fixation d'N<sub>2</sub> et la protection).

Des (ASRKP+ Ochra) sont cultivées sur milieu nutritif liquides obtenus à partir du jus de mélasse après filtration ( 5g/l d'eau). Après une durée de culture dépendant des caractéristiques physiologiques des (ASRKP + Ochra), les mycéliums sont récupérés par filtration, lavés à l'eau courante pour éliminer toutes traces chimiques issues du milieu nutritif utilisé puis broyés au Waring Blender et conservés à 4°C. Des granules de potassium (orthoclase) et/ou phosphate naturel (RP ou Tricalcique phosphate)(5 µm diamètre) sont immergés dans une solution stérile composée (i) de mélasse (5 g l<sup>-1</sup>), préalablement stérilisée (ii) de mycélium (1 g poids sec par litre de mélange). Après 1 heure d'immersion sous agitation, les granules imprégnés par les actinobactéries sont incubés à 28°C pendant 2 jours. Les granules ainsi colonisés par (ASRKP + Ochra) en formant des spores à la surface sont ensuite séchés à l'air et mis des flacons pour conserver à température ambiante et à 4°C. Un autre avantage de cette invention est le fait qu'on peut inoculer directement les semences ou graines par les (ASRKP + Ochra) par le procédé de bactérisation.

**Pour la définition de l'invention, il s'agit de :**

Un nouveau procédé de fabrication, Une nouvelle biotechnologie et d'un un nouvel usage d'un produit existant

**Pour le Problème(s) technique(s) que l'invention permettrait de résoudre :**

- 1) Optimisation de l'effet (ASRKP + Ochra) sur la nutrition minérale totale (NPK : azotée, phosphatée et potassique) de la plante hôte et sa santé en contritions difficiles
- 2) Evite le recours à des engrais chimiques pour améliorer la fertilité du substrat et des sols.
- 3) Augmentation de la qualité des plants produits (meilleure croissance et meilleure résistance à la crise de transplantation)

**Pour mieux décrire l'invention cette exemple :**

Obtention des (ASRKP + Ochra)

L'isolement d'Actinomycètes solubilisateurs de la roche potassique et la roche phosphatière à partir des terricules des fournies des gisements de phosphates marocains. Parmi les 150 isolats retenus, 40 se sont révélés capables de pousser sur un milieu minimum synthétique (SMM) et sur le milieu de Aleksandrov modifié) contenant le l'orthoclase et TCP comme seule source de potassium et du phosphore. Parmi ces isolats, 3 souches ont été sélectionnées du fait de leur combativité naturelle avec le genre *Ochrobacterium* fixateur d'azote atmosphérique, leur activité antifongique contre plusieurs agent phytopathogènes (*Pythium ultimum*, *Fasarium oxysporum* f.sp *abedenis* agent de Bayoud, ) et de leur capacité à produire des phosphatase, des chitinases et de l'Acide Indole Acétique, hormones capables stimuler la croissance des plantes. Par la suite, la capacité de ces souches à relarguer dans le milieu de culture (SMM liquide et Aleksandrov liquide) du potassium K soluble à partir du orthoclase et du P soluble à partir du RP (roche phosphatière) et TCP, fixation de l'azote non combiné N<sub>2</sub> les rendant ainsi disponibles pour la plante, a ensuite été déterminée. Les résultats montrent que les souches sélectionnées sont en effet capables de solubiliser la RK et RP et ceci vraisemblablement par excrétion de substances chélatrices et sans changement significatif du pH. La fixation d'azote des (ASKP + Ochro) a été confirmée par la capacité de pousser sur un milieu sans aucune source d'azoté combinée.

Dans la deuxième étape, les souches solubilisatrices (ASRKP + Ochro) les plus performantes ont été caractérisées sur le plan physiologique (croissance ; excrétion du K, excrétion du P ; fixation de l'azote N<sub>2</sub> ; consommation du glucose, du phosphate, évolution du pH et dosage du contenu cellulaire) lors de leur croissance en milieu SMM et Aleksandrov modifié en présence de P soluble et K soluble ou insoluble (RK et RP). Le séquençage de l'ARN 16S de ces 4 souches (**Planche 1**) a révélé qu'elles appartenaient aux genres *Streptomyces* et *Norcardiopsis* et *Ochrabacterium*. Ce qui montre que ces bactéries ne sont pas pathogènes pour l'homme et pour les végétaux. Selon d'état de la technique, ces bactéries n'ont pas encore été décrites comme biofertilisant (NPK).

Dans la troisième étape de cette invention, il a été démontré que le processus de solubilisation des souches BC 3, BC10 et BC11 est lié à l'excrétion d'une ou plusieurs molécules chélatrices des ions constituant les RK et RP. Le processus de solubilisation implique vraisemblablement la destruction des liaisons ioniques fortes existant entre le calcium ou silice ou autres ions constitutifs des (RP et RK). La souche BC3 apparentée à *Streptomyces* sp. a montré la meilleure capacité solubilisatrice du RK (l'orthoclase et du

RP et ou TCP). Les chélateurs qui existent dans le jus de fermentation ont également une activité antifongique.

L'avant dernière partie de cette invention consiste en la formulation du biofertilisant NPK appelé (NPK-organismes = NPK-OR) (**planche 2**). Pour produire (NPK-OR), BC11+ Ochro, BC10+ Ochro ou BC3 + Ochro sont cultivées sur milieu nutritif liquides obtenus à partir du jus de mélasse (5g/l d'eau) dans un bioréacteur contenant les granules d'orthoclase ou RP broyée. Après une durée de culture de 2 jours à 28°C, les mycélium et les granules colonisés par les hyphes ou filaments sont récupérés par filtration, lavés puis broyés au Waring Blender. Les jus de fermentations représentent un engrais liquide et à activité antifongique. (i) Des granules de potassium (orthoclase) et/ou roche phosphatée (RP ou Tricalcium phosphate) (5 µm diamètre) sont immergés dans une solution stérile composée de mélasse (5 g l<sup>-1</sup>), préalablement stérilisée (ii) de mycélium (1 g poids sec par litre de mélange). Après 1 heure d'immersion sous agitation, les granules imprégnés par les actinobactéries sont incubées à 28°C pendant 2 jours. Les granules ainsi colonisés par (ASRKP + Ochra) en formant des spores à la surface sont ensuite séchés à l'air et mis des flacons pour conserver à température ambiante et à 4°C. La mesure des shelf life ou durée de stockage ont été déterminées et leurs valeurs sont supérieures à 10 mois.

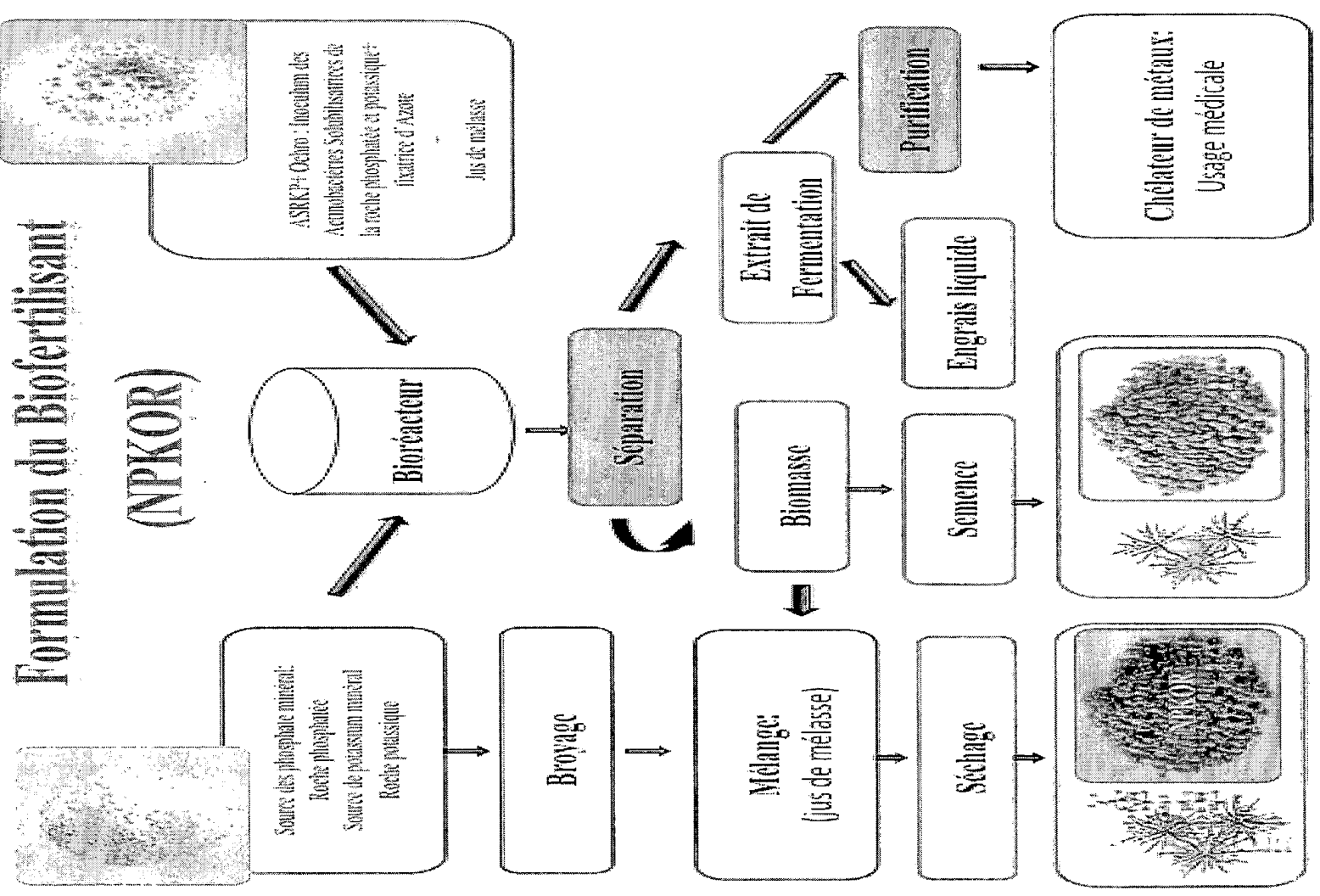
Dans la dernière partie de cette invention, les différentes aptitudes des souches sélectionnées ou produits formulés NPKOR (BC3 + Ochro, BC10 + Ochro ou BC11 + Ochro) ont été testées, sous serre, dans un modèle rhizosphérique constitué d'un sol carencé en azote, riche en RK et RP / souche solubilisatrice / plante de grande culture (Maïs) en présence ou non de l'agent phytopathogène (*Pythium ultimum*). Il a été montré que les 3 NPKOR étaient capables de solubiliser le RK, la RP satisfaire les besoins en azote. En d'autres termes, la promotion et la bonne croissance des plantules du maïs est atteinte avec des valeurs supérieures à celles obtenues avec la fumure de référence pour le produit NPKOR = BC3 + Ochro. Pour les produits, NPKOR, BC10 + Ochro et BC11+ Ochro, ils ont montré la capacité de stimuler la croissance du maïs (15% moins par rapport à l'addition de la fumure ou engrais de référence. Pour l'aspect sanitaire ou protection, les 3 NPKOR sont capables d'inhiber la croissance de *Pythium ultimum* de façon aussi efficace que le 'Mycostop®, un biofongicide commercialisé, dans un sol pauvre en potassium, phosphate et azote utilisable par le maïs.

**REVENDICATIONS**

1. Trois souches d'actinobactérie (BC3, BC10 et BC11), une souche d'*Ochrobacterium* caractérisées par les séquences Seq N° 1, 2, 2 & 4.
2. Utilisation des souches selon la revendication 1 ou des souches mutantes, pour inoculer les particules de la roche phosphatée et/ou potassique ou graines et l'obtention des bio-fertilisants et bio-pesticides.
3. Utilisation des souches de la revendication 1 ou des particules de la roche phosphatée, potassique ou graines inoculées obtenues selon la revendication 2, pour la solubilisation du phosphate ou potassium minéraux et la fixation d'azote N<sub>2</sub> pour la nutrition des plantes.
4. Utilisation des souches de la revendication 1 ou des souches mutantes, pour l'obtention de composés actifs par fermentation dans un milieu liquide des lesdites souches après centrifugation, filtration et purification.
5. Utilisation des souches de la revendication 1 ou des souches mutantes, ou d'un filtrat des cultures obtenues selon la revendication 4 ou d'un composé actif obtenu selon la revendication 4.
6. Utilisation des souches de la revendication 1, ou d'un filtrat des cultures ou composés actifs obtenus selon la revendication 4 ou d'un composé actif obtenu selon la revendication 5
7. Utilisation des souches de la revendication 1 ou des souches mutantes, ou d'un filtrat des cultures obtenues selon la revendication 4 ou d'un composé actif obtenu selon la revendication 6, pour stimuler la croissance des plantes.
8. Utilisation des souches de la revendication 1 ou des souches mutantes, ou d'un filtrat des cultures obtenues selon la revendication 4 ou d'un composé actif obtenu selon la revendication 6, protéger les plantes vis-à-vis des agents phytopathogènes



# Formulation du Biofertilisant (NPKOR)



## PLANCHE DE DESSINS (1)

## &gt;BC3 ADNr 16S (1518 pb)

AATTCGATTAGAGTTTGATCATGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCT  
 TTAACACATGCAAGTCGAACGATGAACCTCCTTCGGGAGGGGATTAGTGG  
 CGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCTGCACCTCTGGGACAAGCC  
 TTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATACTGACCCGCTTGGGCATCCAAGCG  
 TTCGAAAGCTCCGGCGTGCAGGATGAGCCCGCCTATCAGCTTGTGGT  
 GAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGCGA  
 CCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGAGCA  
 GTGGGAATATTGCACAATGGGCGAAATGATGCAGCGACCCGCGTGAGG  
 GATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAG  
 TGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGTAACTACGTGCCAGCAGCCGG  
 GTAATAGCTAGGGCGCGNGGTTGTCCGGAATATTTGGGCGTAAAGAGCTC  
 TAGGGCGGCTTGTACGTCGGTTGTGAAAGCCCGGGCTTAACCCGGTTC  
 TCGAATCGATACGGGCGAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCT  
 GGTGTAGCGGTGAAATGCCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCAAAGC  
 GGATCTCTGGGCCGATATGACGCTGAGAGCGAAACGGGGGAGCGAACAGG  
 ATTAGATACCCCTGGGTAGTCCACGCCTTAGACGGTGGGACTAGGTGTG  
 GCGAATTTCCATTTCGTCGGTTCCGAGCTAAAACCTCAAAGGAATTTGACG  
 GGGGACGCACAAGCGGGGAGCATGTGGCTTAATTCGACCAACGCCGAA  
 GAACCTTCCAGGCTTGACATACACCGAAAGCATCAGAGATGGTGCCCC  
 CTGTGGTCGGGTACAGGTGGTCACTGTGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCG  
 TTGGTTAAGTCCCGCACGAGCGCAACCTTTCGGTGTTCACGACGGCCCT  
 TGTGGTGTGGGACTACGGGAACCGCCGGGTCACTCGGAGGAAGGTG  
 GGACGAGCTCAATCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTA  
 CAATGGCCGGTACAATGAGCTTGATACCGCGAGGTGGAGCGAATCTCAA  
 AAGCCGGTCTCATTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGG  
 AGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGG  
 CCTTGTACACACCGCCCTCAGTACGAAATGTCGGTAACATCCCGAAC  
 CCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGGAAGGGAGGCTGTCGAATGNTGGANCT  
 GCGAGTTGGGANCGAATGTACCTAAGCATACGGTAGCGCGTAAGAAATTT  
 CACCTAGGTGAATTACCCTGGCCCGGCTGCACGGTCCGACCATATTG  
 GAGCGCTACCCTAACG

## &gt;BC10 ADNr 16S (1542 pb)

CGGGGGTTAACCCGGGGTTCGAGTTCCTCGGGCAAGGTTAATCTTGGG  
 GAGGATCGGAATTTTCGGTGTAGGTGAAATGCAGTATGGGGGGGAACCG  
 GGTGGCCGAAGGGCGGAATCTTTTGGGCCGGATACTTGCCTGAAGGAG  
 CGAAAAAGCTGGGGGAGCGAACAGGATTTAGATAACCCTGGTAGTACCCG  
 TAAAACGGTGGGCACTAGGTGTGGGCGACATTCACGTCGTCCGTCCGCC  
 ACTAACGCATTAAGTCCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAAC  
 TCAAAGGAATGACGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAAT  
 TCGACGCAACCGCAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAGCA  
 TCAGAGATGGTGCCTTGTGGTTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTC  
 GTCAGTCCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC  
 CTTGTCCCGTGTGGCAGCAGGCCCTTGTGGTGTGGGACTCACGGGAG  
 ACCGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGTGGGGACGACGTCAAGTCAATCATG  
 CCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGC  
 TCGGATACCGGAGGTGGAGCGAATCTCAAAGCGGCTCTCAGTTCCGGA  
 TTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCCGAGTTCGCTAGTAATCGCAG  
 ATCAGCATTTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCTTGTACACACCGCCCG  
 TCACGTACGAAAGTCCGTAACACGCCTTTTCNCAACCGGGTGTTCCTCC  
 NTAATATCTGGCGCATTTCCCGCTTACACCCAGGGAATTCCTGATNTC  
 CCTACCGAACTTACCTGCCCGTATCGACTGCAGACCGGGGTTAAGCCC  
 CGGGCTTTCACAACCGACGTGACAAGCCCGCTACGAGCTCTTACGCCCA  
 ATAATTCGGGACAACNCGCGCCCTACGTATTACCGCGGCTGTGGCAC  
 GTAGTTAGCCGGCGCTTCTTCTGTCAGGTANCGTCACTTTCGCTTCTTCCC  
 TGCTGAAAGAGGTTTACAACCCGAAGGCCGTCATCCCTCACGGCGGCTCG  
 CTGCATACATTCGCCCATTTGTGCAATATTCCCACTGCTGCCTCCCGTAG  
 GAGTCTGGGCGGTCTCAGTCCAGTGTGGCCGGTCCGCCCTCTCAGGCC  
 GGCTACCCGTCTGCGCTTGGTGAGCCATTACCTCACCAACAGCTGATA  
 GGGCCGGGGCTCATCTGCATCGCCGAGCTTTCGAACGCTTGGATGCC  
 CAAGCGGGTCAATACCGGATTTAGACCCCGTTTCCAGGGCTGTCCCGAG  
 AGTGCAGGGCAGATTGCCACGTGTTACTCACCCGTTCCGCCACTAATCCN  
 CTCCGAAGGAGGTTCACTGTTTCGACTTGAATGTGTTAAAGCACGCCGC  
 CAGCGTTCGTCTGATGCCATGATCAAACCTTAATCACTAG

## &gt;BC11 ADNr 16S (1582)

AATTCGATTAGAGTTTGATCATGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCN  
 TTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAAGGCCCTTCGGGNTACACGAGCGGGC  
 AACGGGTGAGTAACACGTCGACAACCTGCCCTGACTCTGGGATAAGCGGT  
 GGAAACGCCGTCTAATAACCGGATACGACCCGCCACCTCATGGTGNAGGGT  
 GGAAAGTTTTTCGGTCAGGGATGGGCTCGCGGCTATCAGCTGTGGTG  
 GGGTAACGGCTACCAAGGCGATTACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGCGAC  
 CGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTGCGGGAGGCAGCAG  
 TGGGGAATATTCGCAATGGGCGAATGACGCAGCGACGCCGCTGGGGG  
 ATGACGGCTTCGGGTTGTAACCTCTTTTACCACCAACGCAGGCTTCCA  
 GTTCTCTGGAGGTTGACGGTAGGTGGGGAATAAGGACCGGTAACACCT  
 GCCAGCAGCCGGTAATACGTAGGGTCCGAGCGTTGTCGGAATFATTG  
 GGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTGTGCGCTGCTGTGAAAGACCGGG  
 GCTTAACTCCGGTTCTGCAGTGGATACGGCATGCTAGAGGTAGGTAGGG  
 GAGACTGGAATCTCTGGTGTAGCGGTGAAATGCCGAGATATCAGGAGGAA  
 CACCGGTGGCGAAGCGGGTCTCTGGGCTTACCTGACGCTGAGGAGCGAA  
 ACNATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCATGCCGTAATA  
 CGTTGGGCGCTAGNTTGTGGGACTTTCCACGGTTTTCCCGCGCCNT  
 ACTAAACGCATTTAAGCGCCNCCCTGGGGAGTACGGGCCGCAAGGGCTA  
 AAACCTCAAAGGAATTGACGGGGCNCGCACAAGCGGGGAGCATGTTGCT  
 TAATTCCGACGCAACGCGAAGAACCCTTACCAAGTTTGACATCACCCCGT  
 GACTCGCAGAGATGTGAGGTCATTTAGTTGGCGGGTGACAGGTGGTGCAT  
 GGCTGTGCTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAG  
 CGCAACCTTGTTCATGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGACTCATGGGA  
 GACTGCCGGGCTCAACTCGGAGGAAGTGGGGATGACGTCAAGTCATCAT  
 GCCCTTATGTCTTGGGCTGCAAAACATGCTACAATGGCCGGTACAATGGG  
 CGTGGATACCGTAAGGTGGAGCGAATCCCTAAAAGCCGGTCTCAGTTCG  
 GATTGGGGTCTGCAACTCGACCCATGAAGGTGGAGTCTAGTAATCGC  
 GGATCAGCAACGCCCGGCTGAATACGTTCCCGGCCCTTGATACACACCGCC  
 CGTCACGTATGAAAGTCCGTAACACCTGAACGGTGGCCTAACCCTTGTG  
 GAGGGAGCCGTGAAAGTGGGATCGGTAATTAGGACTAAGTCGTAACCAA  
 TGGTACCGTAGAATCACTAGTGAATTTCCCGGCCCTGCAGGTCGACC  
 CATTATGGGAGAGCTCCCCAACGCTGTTAT

## &gt;OCHROBACTERIUM ADNr 16S (1270pb)

ACATTCACTCATAACTCGGTTGGGGAGCTCTCCCAATATGGTCGACCT  
 GCAGGCGGCCGCAAAATCACTAGTGATTAGAGCTTTGATCATGGCTCAG  
 AACGAAACGCTGGCGCAGTATTAAACATGCAAGTCGAGCGCCCCGAGG  
 AGGGCGGACAGACGGGTGAGTAACCGGTGGGAACGTACCTTTTGCTACGG  
 AATAACTCAGGGAACTTGTGCTAATACCGTATGTGCCCTTCGGGGGAAA  
 GATTTATCGGCAAAGGATCGGCCCGGTTGGATTAGCTAGTTGGTGGG  
 AAAGGCTCACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGC  
 CACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG  
 GAATATTGGACAATGGGCGCANGCTGCATCCAGCCATGCCGCTGAGTGA  
 TGAAGGCCCTAGGGTTGTAAGCTCTTACCAGGTGAAGATAATGACGGT  
 AACCGGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC  
 GAAGGGGCTAGCGTTGCTCGGATTTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGC  
 GGACTTTAAGTCAGGGGTGAAATCCCGGGCTCAACCCCGGAACGCTCT  
 TTGATACTGGAAGTCTTGAGTATGGTAGAGGTGAGTGAATTCGAGTGT  
 AGAGGTGAAATTCGTAGATATTCCGAGGAACACAGTGGCGAAGCGGGCT  
 CACTGGACCATTACTGACGCTGAGGTGCGAAACGNTGCTCGAGCAACAG  
 TATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTTAAACGATGAATTTTACGCCG  
 GTGGCGAGTTAATCTTTCGGTGGGCGCAGTAAACCAATTTAAACAT  
 TCCCGCCTTGCAGAGTTTCGGTCCGCAAGATTTAAAAACCAACAAGAGA  
 ATTTAATTGCGGGTCCCGTAAAAGCGTTCGGTAGGATGTTGTTTAA  
 ATTTAAACGACGNGCAAGAAACCTTACGAGCCGCTTCGACACCGGTCGC  
 GGACACAGAGATATATCGGTCCGTCGGCGAAACAGGATACAGGCCGAGA  
 ATTTGCATTGCAGGTTGGGTTGTGAGATGTTGCCCGGATTGCCGCCACT  
 CTAGCCATTGCCAGCTTTTAGACACCATTTACTATGGAATTTGTGGCG  
 GCCGACCGGTGATAAGCCTTCCCGGCTCATGGGGTACACTCAGTCTCTCT  
 TTACCTTTTTGCATGATTG

# Formulation du Biofertilisant

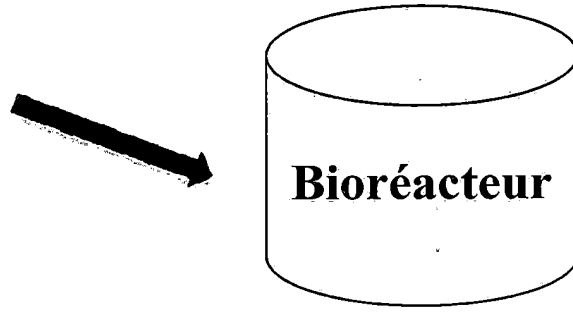
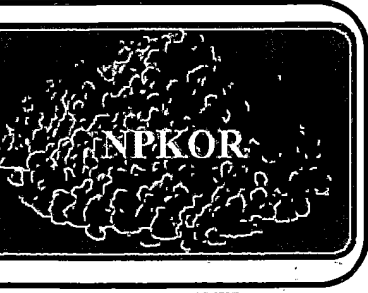
## (NPKOR)

phosphate minéral:  
de phosphatée  
potassium minéral:  
de potassique

royage

mélange:  
(de mélasse)

chage



ASRKP+ Ochro :  
Actinobactéries Sol  
la roche phosphatée  
fixatrice d  
+  
Jus de me

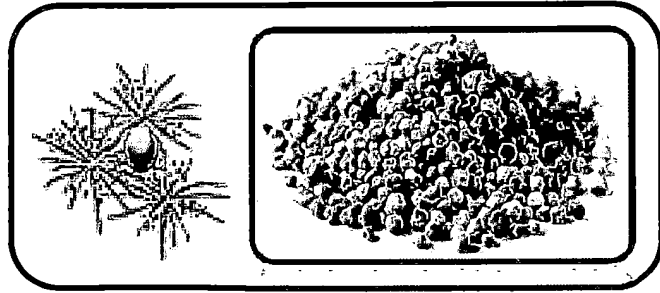
Séparation

Biomasse

Extrait de  
Fermentation

Semence

Engrais liquide



Chélateur  
Usage n

Pu

ROYAUME DU MAROC

\*\*\*\*\*

OFFICE MAROCAIN DE LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE ET COMMERCIALE

\*\*\*\*\*



المملكة المغربية  
المكتب المغربي  
للحماية الصناعية والتجارية

**RAPPORT DE RECHERCHE  
AVEC OPINION SUR LA BREVETABILITE**  
(Conformément aux articles 43 et 43.2 de la loi 17-97 relative à la  
protection de la propriété industrielle telle que modifiée et  
complétée par la loi 23-13)

<b>Renseignements relatifs à la demande</b>	
N° de la demande : 40113	Date de dépôt : 28/03/2017
Déposant : UNIVERSITÉ CADI AYYAD	
Intitulé de l'invention : NOUVELLES SOUCHES D'ACTINOBACTÉRIES SOLUBILISATRICES DES FORMES MINÉRALES DU POTASSIUM ET DU PHOSPHATE CAPABLES DE FIXER L'AZOTE N2 EN ASSOCIATION AVEC OCHROBACTRUM SP. , FORMULATIONS D'INOCULA DE CES BACTÉRIES COMME BIO FERTILISANTS ET LEUR UTILISATION POUR LA NUTRITION ET LA SANTÉ DES PLANTES	
Le présent document est le rapport de recherche avec opinion sur la brevetabilité établi par l'OMPIC conformément aux articles 43 et 43.2, et notifié au déposant conformément à l'article 43.1 de la loi 17-97 relative à la protection de la propriété industrielle telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.	
Les documents brevets cités dans le rapport de recherche sont téléchargeables à partir du site <a href="http://worldwide.espacenet.com">http://worldwide.espacenet.com</a> , et les documents non brevets sont joints au présent document, s'il y en a lieu.	
Le présent rapport contient des indications relatives aux éléments suivants :	
Partie 1 : Considérations générales	
<input checked="" type="checkbox"/> Cadre 1 : Base du présent rapport <input type="checkbox"/> Cadre 2 : Priorité <input type="checkbox"/> Cadre 3 : Titre et/ou Abrégé tel qu'ils sont définitivement arrêtés	
Partie 2 : Rapport de recherche	
Partie 3 : Opinion sur la brevetabilité	
<input type="checkbox"/> Cadre 4 : Remarques de clarté <input checked="" type="checkbox"/> Cadre 5 : Déclaration motivée quant à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle <input type="checkbox"/> Cadre 6 : Observations à propos de certaines revendications dont aucune recherche significative n'a pu être effectuée <input type="checkbox"/> Cadre 7 : Défaut d'unité d'invention	
Examineur: A. BRINI	Date d'établissement du rapport: 19/09/2017
Téléphone: 212 5 22 58 64 14/00	



**Partie 1 : Considérations générales**

*Cadre 1 : base du présent rapport*

Les pièces suivantes de la demande servent de base à l'établissement du présent rapport :

- Description  
4 Pages
- Revendications  
8
- Planches de dessin  
4 Pages

**Partie 2 : Rapport de recherche**

**Classement de l'objet de la demande :**

CIB : C05F11/08, C12N1/20, A01N63/02

CPC : C05F11/08, C12N1/20, A01N63/02

Bases de données électroniques consultées au cours de la recherche :

EPOQUE, Orbit

Catégorie*	Documents cités avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	N° des revendications visées
A	Gloria. Maria Foster Pingak et al "Effectivity of Methanotrophic Bacteria and Ochrobactrum Anthropi as Biofertilizer and Emission Reducer of CH4 and N2O in Inorganic Paddy Fields"; Journal of Medical and Bioengineering Vol. 3, No. 3, September 2014	1-8
A	MA33389B1; UNIVERSITE CADI AYYAD [MA]; 03-07-2012 Document en entier	1-8
A	U. Chakraborty et al "Evaluation of Ochrobactrum anthropi TRS-2 and its talc based formulation for enhancement of growth of tea plants and management of brown root rot disease"; Journal of Applied Microbiology 107 (2009) page 625-634, ISSN 1364-5072	1-8
A	Anuj Rana et al "Prospecting plant growth promoting bacteria and cyanobacteria as options for enrichment of macro- and micronutrients in grains in rice wheat cropping sequence" Cogent Food & Agriculture (2015)	1-8

**\*Catégories spéciales de documents cités :**

-« X » document particulièrement pertinent ; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément  
-« Y » document particulièrement pertinent ; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier  
-« A » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent  
-« P » documents intercalaires ; Les documents dont la date de publication est située entre la date de dépôt de la demande examinée et la date de priorité revendiquée ou la priorité la plus ancienne s'il y en a plusieurs  
-« E » Éventuelles demandes de brevet interférentes. Tout document de brevet ayant une date de dépôt ou de priorité antérieure à la date de dépôt de la demande faisant l'objet de la recherche (et non à la date de priorité), mais publié postérieurement à cette date et dont le contenu constituerait un état de la technique pertinent pour la nouveauté

**Partie 3 : Opinion sur la brevetabilité***Cadre 5 : Déclaration motivée quant à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle*

Nouveauté (N)	Revendications 1-8 Revendications aucune	Oui Non
Activité inventive (AI)	Revendications 1-8 Revendications aucune	Oui Non
Possibilité d'application Industrielle (PAI)	Revendications 1-8 Revendications aucune	Oui Non

Il est fait référence aux documents suivants. Les numéros d'ordre qui leur sont attribués ci-après seront utilisés dans toute la suite de la procédure

D1: Gloria. Maria Foster Pingak et al "Effectivity of Methanotrophic Bacteria and Ochrobactrum Anthropi as Biofertilizer and Emission Reducer of CH<sub>4</sub> and N<sub>2</sub>O in Inorganic Paddy Fields"  
Journal of Medical and Bioengineering Vol. 3, No. 3, September 2014

D2: MA33389B1

D3: U. Chakraborty et al "Evaluation of Ochrobactrum anthropi TRS-2 and its talc based formulation for enhancement of growth of tea plants and management of brown root rot disease"  
Journal of Applied Microbiology 107 (2009) page 625-634, ISSN 1364-5072

**1. Nouveauté (N) :**

Aucun des documents susmentionnés ne divulgue les mêmes caractéristiques techniques telles que décrites dans les revendications 1-8, d'où celles-ci sont nouvelles conformément à l'article 26 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.

**2. Activité inventive (AI) :**

Le document D1 qui est considéré comme étant l'état de la technique le plus proche de l'objet de la revendication 1 divulgue une étude d'efficacité suite à l'application d'une formulation de bio-fertilisant comprenant des bactéries méthanotrophes, Ochrobactrum anthropi, Azotobacter et Azospirillum pour améliorer la croissance du riz, augmenter la productivité des graines et réduire les émissions de méthane (CH<sub>4</sub>) et d'oxyde nitreux (N<sub>2</sub>O).

L'objet de la revendication 1 diffère de D1 en ce que la formulation de bio-fertilisant comprend une association d'une souche d'actinobactérie avec de l'ochrobactrum anthropi.

Le problème que la présente demande se propose de résoudre peut être considéré comme étant la fourniture d'une nouvelle formulation de bio-fertilisant.

La solution proposée par la présente demande n'est pas évidente pour les raisons suivantes :

Le document D2 divulgue un bio-fertilisant comprenant une souche d'actinobactérie pour l'inoculation des particules de la roche de phosphatée et/ou potassique ou graines.

Le document D3 décrit une étude pour évaluer l'ochrobactrum anthropi TRS-2 isolé à partir de la rhizosphère de thé pour la promotion de la croissance et l'amélioration de l'activité antifongique contre six agents pathogènes pour la protection des racines brunes du thé.

Aucun document de l'art antérieur constitué par D1-D3 ne divulgue ni suggère une formulation de biofertilisant comprenant une association d'une souche d'actinobactérie avec ochrobactrum anthropi pour favoriser la croissance, la nutrition et la santé des plantes.

Par conséquent, l'objet de la revendication 1 implique une activité inventive conformément à l'article 28 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.

Les revendications 2-8 dépendent de la revendication 1 et satisfont donc en tant que telles aux exigences concernant l'activité inventive conformément à l'article 28 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.

### **3. Possibilité d'application industrielle (PAI) :**

L'objet de la présente invention est susceptible d'application industrielle au sens de l'article 29 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13, parce qu'il présente une utilité déterminée, probante et crédible.